

バチルス・ポピリエの孢子囊の製造方法

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. FIELD OF THE INVENTION

5 本発明は、バチルス・ポピリエに属する菌を液体培地で培養し、コガネムシ科昆虫の防除剤として有用な孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子囊（以下、「孢子とパラスポラルボディとを含む孢子囊」を単に「孢子囊」ということがある。）を製造する方法に関する。

10 2. DESCRIPTION OF RELATED ART

コガネムシ科昆虫の幼虫は、芝や農園芸作物や樹木等の広範囲な植物の根を食餌し、多大な被害を与えることが知られている。これらコガネムシ科昆虫の幼虫は地中に棲息するため、地上から散布する化学農薬では防除効果が得にくく、また幼虫の棲息場所も特定しにくい。このため広範囲に多量の農薬を散布して地中に農薬を浸透させる必要があり、自然環境や人体に対する悪影響が懸念されるため、より有効な防除方法が切望されていた。

バチルス・ポピリエに属する菌は、コガネムシ科昆虫の幼虫に寄生して乳化病を発病させ最終的にこれらを死に至らしめることが知られている。このため化学農薬が効きにくいコガネムシ科昆虫の防除に前記菌の孢子囊を利用しようとする試みが古くから行われてきた。

例えば、特開 2001-149066 号公報には、バチルス・ポピリエに属する菌を培地に対し 0.05～0.5 質量%の活性炭を含有する固体培地で該菌を培養することにより、孢子囊化率（菌数に対する孢子囊の割合）4.8%で製造する例が記載されている。しかしながら、固体培地を用いた培養法は生産性が低いという問題があった。

固体培地を用いた培養法の前記問題を解決するために、液体培地を用いた培養法が種々検討されている。例えば、ハイネスらはペプトン 0.5%、酵母エキス 1.5%、リン酸水素二カリウム 0.3%、グルコース 0.1%及び活性炭 1%を含む液体培地でバチルス・ポピリエ・NRRL B-2309S の培養を試み

た例を報告している (Journal of Invertebrate pathology, 22巻, 377~381頁, 1973年)。しかし、培養液 1 ml 当たり最大で 2.06×10^7 個の孢子囊しか得られておらず、より高い生産性を達成するためには孢子囊の濃度が低いといった問題があった。

- 5 また、ハynesらは対数増殖後期の成熟したバチルス・ポピリエ・NRRL B-2309Sの菌体をペプトン (トリプトン) 0.5%、酵母エキス1.5%、リン酸水素二カリウム0.3%、グルコース0.1%、活性炭1%を含む液体培地成分で培養することで培養液 1 ml 当たり 3.1×10^7 個の孢子囊を得たと報告している (Journal of Invertebrate pathology, 19巻, 125~130頁, 1972年)。また、この培養方法は培養時間が長く、2週間程度かかっていた。

- さらに、米国特許第4824671号には、1%可溶性デンプン、0.1%トレハロース、0.5%酵母エキス、0.3%リン酸水素二カリウム、0.1%炭酸カルシウムを含む液体培地で培養し、培養液 1 ml 当たり 1×10^9 個の孢子囊が得られた例が挙げられている。しかし、得られた孢子囊にはパラスポラルボ
15 ディが存在せず、このため土壌 1 kg に 2.0×10^{12} 個の割合で孢子囊を散布しコガネムシ科昆虫の幼虫に経口摂取させた際の乳化病感染率は、散布後7週間経過時点で47.50%であり、幼虫体内で形成されたパラスポラルボディを含む孢子囊と比較してコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果は弱かった。

20

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

本発明が解決しようとする課題は、培地単位体積当たりの生産数が高い、バチルス・ポピリエに属する菌の孢子囊の製造方法を提供することにある。

- 本発明は上記課題を解決するために、バチルス・ポピリエに属する菌を、吸着
25 剤を含む液体培地で培養し、孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子囊を製造する方法において、前記液体培地が0.1~0.7質量%のプロリンを含むことを特徴とする孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子囊の製造方法を提供する。

本発明の製造方法によれば、5~10日程度の液体培養で、培養液 1 ml 当た

り、孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子囊を 5×10^7 個以上の割合で、しかも、孢子囊化率が 6～50% と高い水準で製造することができる。また、前記液体培地にピルビン酸を添加することで、培地単位体積当たりの該孢子囊の生産数をさらに高くすることができる。

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

図 1 は、孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエの孢子囊の模式図である。

図 2 は、実施例 2～4、比較例 5～6 における液体培地中のプロリン濃度に対する孢子とパラスポラルボディとを含む孢子囊の生産数の関係を示したグラフである。

図 3 は、生物試験例 1 におけるドウガネブイブイの生育阻害効果を示したグラフである。

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

本発明で用いるバチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*) に属する菌の細菌学的性質は、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー第 8 版 (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition*) によれば、長さが $1.3 \sim 5.2 \mu\text{m}$ 、幅が $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$ のグラム陰性桿菌で、生育温度が $20 \sim 35^\circ\text{C}$ であり、図 1 に示す模式図の如く孢子囊 1 の中に孢子 3 とパラスポラルボディ 2 とを有する。しかし、バチルス・ポピリエはパエニバチルス・ポピリエ (*Paenibacillus popilliae*) に再分類されるべきとのパターソンらの学説 (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49 巻, 531～540 頁, 1999 年) が提示されている。また、リパーら (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48 巻, 395～402 項, 1998 年) 及びハリソンら (*J. Invertebr. Pathol.*, 76 巻, 169～175 項, 2000 年) は、乳化病菌として知られているバチルス・ポピリエ及びバチルス・レンチモルバスを、従来両種を区別する

25

ために用いられてきたパラスポラルボディの存在の有無、2%食塩含有培地中での生育の有無という性質だけで明確に区別することができず、DNAレベルでの分類を提案している。現段階ではその分類扱が明確になっていないため、本発明においてはバチルス・ポピリエに属する菌とはパエニバチルス・ポピリエに属する菌及びパエニバチルス・レンチモルバスに属する菌をも包含するものとする。

本発明で使用する液体培地は、バチルス・ポピリエに属する菌の生育を阻害する物質の除去を目的とした吸着剤を含む。そのような目的で使用する吸着剤としては、例えば、活性炭、吸着樹脂、アロフオサイト又はモレキュラーシーブ等が挙げられる。これらの吸着材の中でも、活性炭が好ましい。活性炭の形状は、粉末状、粒状又はシート状等、いずれであってもよいが、単位質量当たりの分解又は吸着能が最も高い粉末状の活性炭を使用するのが好ましい。

吸着樹脂は、吸着能を有する多孔質重合体を意味し、例えば、粒子状に成型された架橋性多孔質重合体で、粒子内部にまで達する細孔構造により水溶液中の生育阻害物質を効率よく吸着しうる合成樹脂である。そのような吸着樹脂としては、三菱化学社製の芳香族系合成樹脂吸着剤「DIAION HP20」、「DIAION HP21」、「SEPABEADS SP825」、「SEPABEADS SP850」、「SEPABEADS SP70」、「SEPABEADS SP700」、置換芳香族系合成樹脂吸着剤「SEPABEADS SP207」、アクリル系合成樹脂吸着剤「DIAION HP2MG」などが挙げられる。

本発明で使用する液体培地中の吸着剤の含有率は、液体培地の0.05～5質量%が好ましい。液体培地中の吸着剤の含有率を0.05質量%以上とすることにより、菌の生育阻害物質の吸着、除去効果が十分発揮される傾向にあり、また、液体培地中の吸着剤の含有率を5%以下とすることにより、菌の増殖に必要な栄養源が吸着剤に吸着される量を抑えることができる傾向にあり、該範囲内でバチルス・ポピリエに属する菌の増殖促進効果が高いので好ましい。

本発明で使用する液体培地中のプロリンの含有率は、液体培地の0.1～0.7質量%が好ましく、0.2～0.6質量%が特に好ましい。液体培地中のプロリンの含有率が0.1質量%未満である場合、及び0.7質量%を超える場合、

菌の増殖促進効果が低下するだけでなく培地単位体積当たりの孢子囊の生産数も低下する。

本発明で使用する液体培地は、バチルス・ポピリエに属する菌を培養する公知の液体培地に、前記した含有率となるようにプロリンと吸着剤とを含有させたものを使用すればよい。

そのような公知の液体培地に含まれる成分としては、例えば、窒素源、炭素源及び無機塩が挙げられる。

窒素源としては、通常、微生物の培養に用いられるアンモニア、硝酸及びそれらの塩等の無機窒素源、ペプトン、肉エキス、魚肉エキス、ラクトアルブミン水解物又は酵母エキス等の有機性窒素源が挙げられ、これらの中でも、ペプトン、ラクトアルブミン水解物又は酵母エキスが特に好ましい。本発明に用いる窒素源の液体培地中の含有率は、0.001～5質量%が好ましく、0.2～4質量%が特に好ましい。

上記窒素源中には各種のアミノ酸が含まれており、各種アミノ酸の中にはプロリンも含まれるが、その含有量がごく微量である。本発明の製造方法では、公知の液体培地に別途プロリンを添加し、液体培地中の全アミノ酸に対するプロリンの割合を10～65質量%とするのが好ましく、25～50質量%とするのが特に好ましい。

前記した全アミノ酸とは、通常、液体培地成分として用いられるペプトンや酵母エキス等の窒素源に含まれていることが知られているアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、チロシン及びバリンからなる16種類の遊離型アミノ酸をいう。これら16種類の遊離型アミノ酸の合計量は、ペプトンや酵母エキス等に含まれる総ての遊離型アミノ酸量を概ね示すものとしてしばしば用いられるものである。

本発明においては炭素源として、デンプン、トレハロース、シュクロース等の糖類や、廃糖蜜、デンプン分解物、チーズホエー等の農産廃棄物を使用することができる。これらの炭素源の含有率は、液体培地の0.001～5質量%が好ましい。ただし、グルコースはバチルス・ポピリエに属する菌の増殖には適する

ものの、胞子とパラスポラルボディとを含む胞子嚢の形成を阻害する傾向があるので該液体培地に含まれるグルコース濃度は液体培地の0.01質量%以下とするのが好ましい。

無機塩としては、通常の微生物の培養に用いられる塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、炭酸ナトリウム又はリン酸塩等の無機塩が挙げられ、このうちリン酸塩が好ましく、さらにリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム又はリン酸水素二ナトリウムが特に好ましい。該無機塩の含有率は、液体培地の1質量%以下が好ましい。

これらの他に、本発明の効果を損なわない範囲内でpH調整剤等の公知の添加剤を使用しても良い。

以上述べた液体培地成分のうち、本発明の製造方法に用いる好ましい液体培地例を以下の表 1 に挙げる。

表 1

液体培地	培地成分（含有率）あるいは pH
例 1	プロリン（0.1～0.7質量%） 吸着剤（0.05～5質量%） ペプトン、酵母エキス及びラクトアルブミン水解物 （0.001～5質量%） トレハロース（0.001～5質量%） 水 pH（6.5～8.5）
例 2	プロリン（0.1～0.7質量%） 吸着剤（0.05～5質量%） ペプトン及び酵母エキス（0.001～5質量%） トレハロース（0.001～5質量%） 水 pH（6.5～8.5）

また、本発明で使用するプロリンと吸着剤とを含有する液体培地に、さらにピルビン酸を加えることが好ましい。液体培地にピルビン酸を加えることによって、バチルス・ポピリエに属する菌の増殖をさらに促進し、かつ孢子とパラスポラルボディとを含む孢子嚢の培地単位体積当たりの生産数をさらに高くすることができる。なお、本発明で使用するピルビン酸には、ピルビン酸の生理学的に許容される塩を含む。具体的にピルビン酸の生理学的に許容される塩としてはピルビン酸ナトリウム、ピルビン酸カリウム等が挙げられる。

液体培地にピルビン酸を加える場合の液体培地中のピルビン酸の含有率は、液体培地の0.01~0.5質量%が好ましく、0.03~0.3質量%が特に好ましい。液体培地中のピルビン酸の含有率を0.01~0.5質量%とすることによって、バチルス・ポピリエに属する菌の高い増殖促進効果と培地単位体積当たりの前記孢子嚢の生産数をさらに高くすることができる。

バチルス・ポピリエに属する菌の増殖に適した培養温度は、25~32℃である。また、液体培地のpHは、6.5~8.5が好ましく、7~8が特に好ましい。液体培地のpHを調整する方法としては、各種の緩衝液や塩酸又は硫酸など通常用いられる酸、あるいは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム又はアンモニアなど、通常用いられるアルカリを添加する方法が挙げられる。

液体培地による培養は、回分培養、連続培養、半回分培養又は流加培養など、いずれの方式で行っても良い。培養時間は、培養方法、培養温度、培養pH又は接種菌体量によって異なるが、通常、回分培養の場合で5~10日である。

培養終了後に培養物から孢子とパラスポラルボディとを含む孢子嚢を回収する方法は、培養液から遠心分離や濾過等の一般的な分離方法で該孢子嚢を含む菌体を分離し回収すればよい。この際、必要に応じて、水や緩衝液を使った洗浄操作を加えてもよい。

本発明の製造方法によれば、バチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢を、孢子嚢化率6~50%で製造することができ、かつ該孢子嚢の数を培養液1ml当たり $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個の割合で製造することができる。

本発明の製造方法により得られた孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢は、コガネムシ科昆虫に殺虫活性又は幼虫の生

育抑制等の防除効果を示し、コガネムシ科昆虫の防除剤として有用である。

バチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*) に属する菌株の中で、顕著にコガネムシ科昆虫の幼虫に生育阻害若しくは殺虫活性を示す菌種としては、バチルス・ポピリエ・セマダラ (*Bacillus popilliae* Semadara, FERM BP-8068)、バチルス・ポピリエ・マメ (*Bacillus popilliae* var. *popilliae* Mame, FERM BP-8069)、バチルス・ポピリエ・ヒメ (*Bacillus popilliae* var. *popilliae* Hime, FERM P-17660)、バチルス・ポピリエ・サクラ (*Bacillus popilliae* var. *popilliae* Sakura, FERM P-17662)、バチルス・ポピリエ・デュトキ (*Bacillus popilliae* Dutky, ATCC No. 14706)、バチルス・ポピリエ・メロロンサ (*Bacillus popilliae* subsp. *melolonthae*) 等が挙げられる。なお、バチルス・ポピリエ・セマダラは、平成10年5月21日に工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受託番号FERM P-16818で寄託され、平成14年6月10日にブタペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-8068が付与されている。また、バチルス・ポピリエ・マメは、平成11年11月25日に工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に受託番号FERM P-17661で寄託され、平成14年6月10日にブタペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-8069が付与されている。

一方、防除対象のコガネムシ科昆虫としては、ドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*)、セマダラコガネ (*Blitopertha orientalis*)、マメコガネ (*Popillia japonica*)、ウスチャコガネ (*Phyllopertha diversa*)、チャイロコガネ (*Adoretus tenuimaculatus*)、ヒメコガネ (*Anomala rufocuprea*) 等が挙げられる。

本発明の製造方法により製造した孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢は、それらを懸濁した液のままコガネムシ科昆虫の防除剤として用いても良く、または乾燥して粉末にして散布しても良い。また乾燥した粉末を水あるいは緩衝液との懸濁液とし、土壤に散布しても良い。しかし、通常は該孢子嚢を農薬に用いられる慣用の添加剤と共に通常の微生物農薬の製造方法で製剤化してコガネムシ科昆虫の防除剤として施用することが好ましい。また、本発明の製造方法により得られる孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢を他の微生物製剤に混合して使用することも可能である。前記防除剤中に含まれる孢子とパラスポラルボディとを含む孢子嚢の含有率は、コガネムシ科昆虫に防除効果を示す範囲であれば特に限定されるものではないが、例えば、施用に際して水和剤、乳剤では防除剤1リットル当たり孢子嚢が $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{13}$ 個程度となるよう調製することが好ましく、粉剤、粒剤では防除剤1g当たり $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 個程度となるよう調製することが好ましい。

防除剤の施用方法としては、剤型や対象作物等によって適宜選択され、例えば、地上液剤散布、地上固形散布、空中液剤散布、空中固形散布、施設内施用、土壤混和施用又は土壤灌注施用等の方法を挙げることができる。また、他の薬剤、すなわち殺虫剤、殺線虫剤、殺ダニ剤、除草剤、殺菌剤、植物生長調節剤、肥料又は土壤改良資材（泥炭、腐植酸資材又はポリビニルアルコール系資材等）等と混合して施用、あるいは混合せずに交互施用または同時施用することもできる。

前記防除剤の施用量は、コガネムシ科昆虫の種類、適用植物の種類及び剤型等によって異なるため一概には規定できないが、例えば、地上散布する場合、本発明の孢子とパラスポラルボディとを含む孢子嚢の施用量が1アール当たり $10^0 \sim 10^{15}$ 個、好ましくは1アール当たり $10^{11} \sim 10^{14}$ 個程度となるようにすればよい。

実施例

以下、実施例及び試験例により本発明を更に具体的に説明する。

(参考例 1)

各実施例の液体培地に添加したペプトン、酵母エキスを及びラクトアルブミン水解物中に含まれる遊離型アミノ酸の含有量は、オルトフタルアルデヒド (OPA) を用いた下記のポストカラム法により測定した。

(1) 試料の調製

標準試料としてアミノ酸混合標準液 H 型 (和光純薬社製、各アミノ酸 2.5 ミリモル/リットルを含む) を濃度 0.02 モル/リットルの塩酸で 5 倍希釈し、ポアサイズ 0.2 μm のフィルターで濾過して、標準試料溶液とした。

測定試料は、ペプトンとして「ポリペプトン S」 (日本製薬社製)、「トリプトン」 (ディフコ社製) を、酵母エキスとしてオクソイド社製、ディフコ社製のものを、及びラクトアルブミン水解物として和光純薬社製のものを、それぞれ用い、1.0 質量% 溶液を各々調製し、これらを 10 質量% トリクロロ酢酸水溶液で 2 倍希釈し、よく攪拌した後、遠心分離により不溶性沈殿を除去した。その後、上清をポアサイズ 0.2 μm のフィルターで濾過して各測定試料溶液を調製した。

(2) 分析

標準試料溶液および各測定試料溶液につき、10 μl を高速液体クロマトグラフィーに注入し、アミノ酸分析を行った。なお、アミノ酸分析は日立製作所製のアミノ酸自動分析装置「L a C h r o m」を使用して行った。なお、該アミノ酸分析に用いた OPA 標識用反応液及び溶離液の組成を表 2 及び 3 に記載した。

表 2

OPA 標識用反応液	R 1	R 2	R 3
ホウ酸		21.6 g	21.6 g
水酸化ナトリウム	24.0 g		
25 %Brij-35溶液		4.0ml	4.0ml
オフトタルアルデヒド / メタノール			800mg / 10ml
2-メルカプトエタノール			2.0ml
5 %次亜塩素酸ナトリウム溶液		150.0 μ l	
蒸留水	残部	残部	残部
全量	1000ml	1000ml	1000ml

表 3

溶離液	A	B	C
クエン酸ナトリウム2H ₂ O	8.14g	26.67g	
塩化ナトリウム	7.07g	54.35g	
クエン酸H ₂ O	20.00g	6.10g	
水酸化ナトリウム			8.0g
エタノール	110ml		
カプリル酸	0.1ml	0.1ml	0.1ml
蒸留水	残部	残部	残部
全量	1000ml	1000ml	1000ml

- 5 試薬は全て和光純薬社製を使用し、クエン酸ナトリウム2H₂O、クエン酸H₂O、カプリル酸はアミノ酸分析用、その他は特級品を使用した。標準試料溶液及び各測定試料溶液より得られたピークエリアから換算して、各測定試料中に含まれるL-プロリン及び全アミノ酸の濃度を算出し表4に示した。

表 4

	ペプトン		酵母エキス		テトラアルブミン 水解物
	ポリペプトンS	トリプトン	オクソイド社製	ディフコ社製	
プロリン濃度 (質量%)	0.000	0.124	0.419	0.285	0.103
全アミノ酸の 合計濃度 (質量%)	17.878	21.653	36.668	31.452	27.369

(調製例 1)

ビーカーに蒸留水 700 g を入れ、添加するアミノ酸として L-プロリン（和
 5 光純薬社製特級）5 g、ペプトン（日本製薬社製「ポリペプトン S」）5 g、酵
 母エキス（オクソイド社製）5 g 及びトレハロース二水和物（和光純薬社製特
 級）5 g を混合した。さらに攪拌しながら濃度 5 モル／リットルの水酸化カリウ
 ム水溶液を添加して pH を 7.6 に調整した後、更に蒸留水を加えて最終的に 8
 50 g とした。この液体培地を、pH 電極を備えた発酵槽（丸菱バイオエンジニア
 10 製）に移し、121℃、60 分間、オートクレーブにて殺菌した。

次に、フラスコに活性炭素粉末（和光純薬社製特級）3 g 添加し、さらに蒸留
 水を加えて 100 g とし活性炭分散液を調製した。また、フラスコに消泡剤（日
 本油脂社製「ディスホーム CA-123」）1 g を添加し、さらに蒸留水を添加
 して 50 g とし、消泡剤液を調製した。活性炭分散液及び消泡剤液を殺菌した
 15 後、上記発酵槽に無菌的に加えて、液体培地（A）を得た。

(比較調製例 1)

調製例 1 において、活性炭を加えなかった以外は、調製例 1 と同様にして、液
 体培地（B-1）を得た。

20

(比較調製例 2)

調製例 1 において、L-プロリンを加えなかった以外は、調製例 1 と同様にし

て、液体培地（B－2）を得た。

（比較調製例 3）

調製例 1 において、L－プロリンに代えて、L－アラニン（和光純薬社製特級）5 g を加えた以外は、調製例 1 と同様にして、液体培地（B－3）を得た。

表 5

液体培地名		培地 A	培地 B－1	培地 B－2	培地 B－3
培 地 成 分	添加したアミノ酸	L－プロリン5g	L－プロリン5g	—	L－アラニン5g
	活性炭	3 g	—	3 g	3 g
	ペプトン	5 g	5 g	5 g	5 g
	酵母エキス	5 g	5 g	5 g	5 g
	トレハロース二水和物	5 g	5 g	5 g	5 g
	消泡剤	1 g	1 g	1 g	1 g
	蒸留水	残部	残部	残部	残部
全量		1 0 0 0 g	1 0 0 0 g	1 0 0 0 g	1 0 0 0 g

（比較調製例 4）

10 フラスコに蒸留水 8 0 g を入れ、さらにペプトン（ディフコ社製「トリプトン」）0. 5 g、酵母エキス（オクソイド社製）1. 5 g、リン酸水素二カリウム（和光純薬社製特級）0. 3 g、グルコース（和光純薬社製特級）0. 1 g 及び活性炭素粉末（和光純薬社製特級）1. 0 g を混合し、更に蒸留水を加えて最終的に 1 0 0 g とした後、1 2 1℃、2 0 分間、オートクレーブにて殺菌して、
15 液体培地（B－4）を得た。

表 6

培地名		B - 4
培 地 成 分	活性炭	1.0 g
	トリプトン	0.5 g
	酵母エキス	1.5 g
	グルコース	0.1 g
	リン酸水素二カリウム	0.3 g
	蒸留水	残部
全量		100g

(実施例 1)

- 予め特開 2001-149066 号公報に記載の公知の固体培養による方法で
- 5 バチルス・ポピリエ・セマダラ (FERM BP-8068)、バチルス・ポピリエ・サクラ (FERM P-17662) 又はバチルス・ポピリエ・マメ (FERM BP-8069) の孢子嚢を培養した。さらに、各々無菌的に回収し顕微鏡による直接検鏡計測で蒸留水 1 ml 中に孢子とパラスポラルボディとを含む孢子嚢の数が 1×10^9 個となるよう調整し、孢子嚢液を作製した。
- 10 各菌株の孢子嚢液を 1 ml ずつプラスチックチューブに分注し、ヒートブロックで 70℃、20 分間の加熱処理を行った。前記した発酵槽 (丸菱バイオエンジニアリング社製) 中で、液体培地 (A) に孢子嚢液を各 1 ml 接種し、発酵槽に備え付けられた攪拌翼を毎分 150 回転で回転させることによって、液体培地を攪拌しながら、通気 1 v v m、30℃、pH 7.6 制御の条件で 7 日間培養した。
- 15 培養終了後、培養液中の単位容積当たりの孢子とパラスポラルボディを含む孢子嚢の数及び菌数を顕微鏡 (株式会社ニコン製「ECLIPSE E600」倍率 3800 倍) による直接検鏡で計測し、菌数に対する孢子嚢数の比率 (以下、孢子嚢化率という) を算出し、培養液 1 ml 当たりの孢子嚢数と孢子嚢化率を表 7～9 に示した。

(比較例 1 ～ 3)

実施例 1 において、液体培地 (A) に代えて、液体培地 (B-1)、(B-2) 及び (B-3) をそれぞれ用いた以外は、実施例 1 と同様にして培養し、実施例 1 と同様にして、培養液中の単位体積当たりの孢子とパラスポラルボディを含む孢子囊の数及び菌数を計測し、孢子囊化率を算出し、培養液 1 ml 当たりの孢子囊数と孢子囊化率を表 7 ～ 9 に示した。

(比較例 4)

実施例 1 において、液体培地 (A) に代えて、液体培地 (B-4) を用い、攪拌条件を毎分 100 回転とした以外は、実施例 1 と同様にして培養し、実施例 1 と同様にして、培養液中の単位体積当たりの孢子とパラスポラルボディを含む孢子囊の数及び菌数を計測し、孢子囊化率を算出し、培養液 1 ml 当たりの孢子囊数と孢子囊化率を表 7 ～ 9 に示した。

15 バチルス・ポピリエ・セマダラの培養

表 7

培地名	液体培地中の プロリン濃度 (質量%)	全アミノ酸に 対する プロリンの割合 (質量%)	孢子囊数 (個/ml)	孢子囊化率 (%)
A	0.502	64.977	1.1×10^8	6.2
B-1	0.502	64.977	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-2	0.002	0.768	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-3	0.002	0.768	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-4	0.007	1.049	$< 1.0 \times 10^4$	0

バチルス・ポピリエ・サクラの培養

表 8

培地名	液体培地中の プロリン濃度 (質量%)	全アミノ酸に 対する プロリンの割合 (質量%)	孢子嚢数 (個/ml)	孢子嚢化率 (%)
A	0.502	64.977	1.4×10^8	6.9
B-1	0.502	64.977	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-2	0.002	0.768	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-3	0.002	0.768	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-4	0.007	1.049	$< 1.0 \times 10^4$	0

バチルス・ポピリエ・マメの培養

5 表 9

培地名	液体培地中の プロリン濃度 (質量%)	全アミノ酸に 対する プロリンの割合 (質量%)	孢子嚢数 (個/ml)	孢子嚢化率 (%)
A	0.502	64.977	1.4×10^8	7.1
B-1	0.502	64.977	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-2	0.002	0.768	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-3	0.002	0.768	$< 1.0 \times 10^4$	0
B-4	0.007	1.049	$< 1.0 \times 10^4$	0

表 7～9 に示した結果から、吸着剤とプロリンとを添加した液体培地においてのみ孢子嚢が得られ、該孢子嚢中には 1 つの孢子と 1 つのパラスポラルボディが含まれていることを顕微鏡観察によって確認した。

(調製例 2)

ビーカーに蒸留水 700 g を入れ、L-プロリン（和光純薬社製特級）0.1 g、ペプトン（日本製薬社製「ポリペプトン S」）7.5 g、酵母エキス（オクソイド社製）7.5 g、ラクトアルブミン水解物（和光純薬社製）5 g、トレハロース二水和物（和光純薬社製特級）5 g を混合した。攪拌しながら、濃度 5 モル／リットルの水酸化カリウム水溶液を添加して pH を 7.6 に調整した後、更に蒸留水を加えて 850 g とした。この液体培地を、pH 電極を備えた発酵槽（丸菱バイオエンジニアリング社製）に移し、121℃、60 分間、オートクレーブにて殺菌した。

次に、フラスコに活性炭素粉末（和光純薬社製特級）3 g を添加し、蒸留水を加えて 100 g として活性炭分散液を調製した。また、フラスコに消泡剤（日本油脂社製「デイスホーム CA-123」）1 g を添加し、さらに蒸留水を加えて 50 g とし消泡剤液を調製した。該活性炭分散液及び消泡剤液を殺菌し、その後各発酵槽に無菌的に加え、液体培地（C-1）を得た。

(調製例 3 及び 4)

調製例 2 において、L-プロリンの添加量を 0.2 g 及び 0.5 g にそれぞれ変更した以外は、調製例 2 と同様にして、液体培地（C-2）及び（C-3）をそれぞれ得た。

(比較調製例 5)

調製例 2 において、L-プロリンを加えなかった以外は、調製例 2 と同様にして、液体培地（D-1）を得た。

(比較調製例 6)

調製例 2 において、L-プロリンの添加量を 0.8 g に変更した以外は、調製例 2 と同様にして、液体培地（D-2）を得た。

表 10

液体培地名		D-1	C-1	C-2	C-3	D-2
培 地 成 分	L-プロリン	—	0.1 g	0.2 g	0.5 g	0.8 g
	活性炭	3 g	3 g	3 g	3 g	3 g
	ペプトン	7.5 g	7.5 g	7.5 g	7.5 g	7.5 g
	酵母エキス	7.5 g	7.5 g	7.5 g	7.5 g	7.5 g
	ラクトアルブミン水解物	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
	トレハロース二水和物	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
	消泡剤	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
	蒸留水	残部	残部	残部	残部	残部
全量		1000 g	1000 g	1000 g	1000 g	1000 g

(実施例 2～4、比較例 5～6)

5 予め特開 2001-149066 号公報に記載の公知の固体培養による方法で
 バチルス・ポピリエ・セマダラ (FERM BP-8068) の孢子嚢を培養し
 た。さらに、無菌的に回収し顕微鏡による直接検鏡計測で蒸留水 1 ml 中に孢子
 とパラスポラルボディとを含む孢子嚢の数が 1×10^9 個となるよう調整し、孢
 子嚢液を作製した。

10 孢子嚢液を 1 ml ずつプラスチックチューブに分注し、ヒートブロックで 7
 0℃、20 分間の加熱処理を行った。これを液体培地 (C-1)～(C-3) 及
 び液体培地 (D-1)～(D-2) のそれぞれに 1 ml 接種し、実施例 1 と同じ
 条件で、7 日間培養した。

15 培養終了後、培養液中の単位体積当たりの孢子嚢数及び菌数を顕微鏡による直
 接検鏡で計測し孢子嚢化率を算出した。表 11 に培養液 1 ml 当たりの菌数と孢
 子嚢数と孢子嚢化率を示した。

表 1 1

培地名	液体培地中の プロリンの 含有率 (質量%)	全アミノ酸に 対する プロリンの 割合(質量%)	菌数 (個/ml)	孢子囊数 (個/ml)	孢子囊化率 (%)
D-1	0.004	0.670	5.6×10^8	$< 1.0 \times 10^4$	0
C-1	0.104	16.048	1.5×10^9	8.2×10^7	5.5
C-2	0.204	27.302	1.1×10^9	1.6×10^8	10.6
C-3	0.504	48.154	1.8×10^9	1.8×10^8	10.0
D-2	0.804	59.710	3.5×10^8	$< 1.7 \times 10^7$	0

培地 (C-1) ~ (C-3) を用いた実施例 2 ~ 4 で得られた孢子囊には 1 つの孢子と 1 つのパラスポラルボディが含まれていた。また、表 1 1 の結果をもとに、液体培地中のプロリン濃度と孢子囊生産数の関係を図 2 に示した。図 2 からプロリンの至適濃度範囲が 0.1 ~ 0.7 質量% の範囲であることがわかった。

(調製例 5)

ビーカーに蒸留水 700 g を入れ、L-プロリン (和光純薬社製特級) 5 g、ピルビン酸ナトリウム (和光純薬社製特級) 1 g、ペプトン (日本製薬社製「ポリペプトン S」) 7.5 g、酵母エキス (オクソイド社製) 7.5 g、ラクトアルブミン水解物 (和光純薬社製) 5 g、トレハロース二水和物 (和光純薬社製特級) 5 g を混合した。続いて、攪拌しながら 4 モル/リットルの水酸化ナトリウム水溶液を添加して pH を 7.6 に調整した後、更に蒸留水を加えて、最終的に 850 g とした。調製した液体培地を pH 電極を備えた発酵槽 (丸菱バイオエンジニアリング社製) に入れて 121℃、50 分間、オートクレーブにて殺菌した。

次に、フラスコに活性炭素粉末 (和光純薬社製特級) 2.5 g を添加し、さらに蒸留水を加えて 100 g として活性炭分散液を調製した。また、フラスコに消泡剤 (日本油脂社製「ディスホーム CA-123」) 1 g を添加し、さらに蒸留水を加えて 50 g とし消泡剤液を調製した。該活性炭分散液及び消泡剤液を殺菌

し、その後発酵槽に無菌的に加え、液体培地（E－1）を得た。

（調製例 6）

調製例 6 において、ピルビン酸ナトリウムの添加量を 2.5 g とした以外は、
5 調製例 6 と同様にして、液体培地（E－2）を得た。

（比較調製例 7）

調製例 6 において、L－プロリンを加えなかった以外は、調製例 6 と同様にし
て、液体培地（F）を得た。

10

表 1 2

液体培地名		E－1	E－2	F
培 地 成 分	L－プロリン	5 g	5 g	－
	ピルビン酸ナトリウム	1 g	2.5 g	1 g
	活性炭	2.5 g	2.5 g	2.5 g
	ペプトン	7.5 g	7.5 g	7.5 g
	酵母エキス	7.5 g	7.5 g	7.5 g
	ラクトアルブミン水解物	5 g	5 g	5 g
	トレハロース二水和物	5 g	5 g	5 g
	消泡剤	1 g	1 g	1 g
	蒸留水	残部	残部	残部
全量		1000 g	1000 g	1000 g

（実施例 5～6、比較例 7）

実施例 2 と同様にしてバチルス・ポピリエ・セマダラを種菌として用い、液体
15 培地（E－1）～（E－2）及び液体培地（F）に各 1 ml ずつ無菌的に植菌し
て前記した発酵槽（丸菱バイオエンジニアリング社製）中で、培養を開始した。培養条件は
温度 29℃、通気量 0.5 vvm、発酵槽に備え付けられた攪拌翼の回転数を毎

分150回転とし、培養中は濃度4モル／リットルの水酸化ナトリウム水溶液及び4モル／リットルの硫酸にてpH7.6に制御した。

培養を5日間行い、培養液中の単位容積当たりの孢子嚢数及び菌数を顕微鏡による直接検鏡で計測し孢子嚢化率を算出し、その結果を表13に示した。

5

表13

培地名	液体培地中の プロリン 濃度 (質量%)	全アミノ酸に 対する プロリンの 割合(質量%)	菌数 (個/ml)	孢子嚢数 (個/ml)	孢子嚢化率 (%)
E-1	0.504	48.154	1.4×10^9	2.0×10^8	14.3
E-2	0.504	48.154	1.6×10^9	4.8×10^8	29.3
F	0.004	0.680	1.0×10^9	$< 1.0 \times 10^4$	0

液体培地(E-1)及び(E-2)を用いた実施例5及び6で得られた孢子嚢には1つの孢子と1つのパラスポラルボディが含まれていた。また、表13の結果から明らかなように、ピルビン酸ナトリウムを添加し、かつ、pHを制御することで孢子とパラスポラルボディとを含む孢子嚢の培地単位体積当たりの生産数をさらに高くすることができた。

(生物試験例1)

15 本発明の製造方法により得られた孢子嚢によるコガネムシ科昆虫の幼虫の生育抑制効果試験を行った。

実施例2の液体培地(A)を用いた培地で取得したバチルス・ポピリエ・セマダラの孢子嚢を蒸留水に 2×10^8 個/mlとなるよう懸濁させて懸濁液(I)を調製した。さらに、該孢子嚢を含む懸濁液をフレンチプレス処理し、孢子嚢から孢子とパラスポラルボディとを分離し各々取り出した。分離した孢子を蒸留水に 2×10^8 個/mlとなるよう懸濁させ懸濁液(II)を調製した。また、分離したパラスポラルボディを蒸留水に 2×10^8 個/mlとなるよう懸濁させ懸濁

20

液 (III) を調製した。

腐葉土を約 20 g ずつ入れた直径 6 cm のプラスチックカップを 80 個準備した。

(i) プラスチックカップ 20 個に対し、孢子囊数が 2×10^8 個/カップとなるように孢子とパラスポラルボディとを含む孢子囊を含む懸濁液 (I) を散布した。

(ii) プラスチックカップ 20 個に対し、孢子数が 2×10^8 個/カップとなるように孢子のみを含む懸濁液 (II) を散布した。

(iii) プラスチックカップ 20 個に対し、パラスポラルボディ数が 2×10^8 個/カップとなるようにパラスポラルボディのみを含む懸濁液 (III) を散布した。

(iv) 残りの 20 個には何も散布せず、対照試験とした。

それぞれのカップにドウガネブイブイ 2 令幼虫を 1 頭ずつ入れ、25℃の培養装置内で 30 日間飼育し、経時的に幼虫の死亡率と生存幼虫の平均体重の増加量を測定した。累積死亡率について表 14 に示し、生育抑制効果について図 3 に結果を示した。

表 14

試験区	累積死亡率 (%)		
	11日目	23日目	30日目
(i)	20	40	45
(ii)	0	5	10
(iii)	15	20	25
(iv) 対照	0	0	0

表 14 及び図 3 から明らかなように、孢子のみの場合やパラスポラルボディのみの場合と比較し、孢子とパラスポラルボディとを含む孢子囊がコガネムシ科昆虫の幼虫に対し優れた殺虫効果及び幼虫の生育抑制効果を有することが確認され

た。

(生物試験例 2)

本発明の製造方法（液体培養）により得られた孢子嚢によるコガネムシ科昆虫
5 の殺虫試験を行った。

直径 6 c m のプラスチックカップ 6 0 個に腐葉土を約 2 0 g ずつ入れ各 2 0 個
に対し各々下記 (i) 又は (ii) の孢子嚢を含む孢子嚢液を該孢子嚢数が 1×1
 0^9 個／カップとなるように散布した。

ただし、散布した孢子嚢液は、(i) 実施例 1 の液体培地 (A) を用いた培養
10 で取得した、孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエ・セマダラ
の孢子嚢、及び (ii) 実施例 1 の液体培地 (A) を用いた培養で取得した、孢子
とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエ・マメの孢子嚢をそれぞれを
用いた。

また、残りの 2 0 個には孢子嚢液を散布せず、対照試験とした。それぞれのカ
15 ュップにドウガネブイブイ 2 令幼虫を 1 頭ずつ入れ、2 5 ℃の培養装置内で 4 0 日
間飼育し、経時的に死亡個体数を調べ、累積死亡率 (%) を求め、その結果を表
1 5 にまとめて示した。

表 1 5

	累積死亡率 (%)			
試験区	1 0 日目	2 0 日目	3 0 日目	4 0 日目
(i)	2 5	4 0	9 0	1 0 0
(ii)	1 5	4 0	7 5	8 0
対照	0	0	0	0

表 1 5 に示した結果から、4 0 日目では 8 0 ~ 1 0 0 % の死亡率が観察され
た。すなわち、バチルス・ポピリエに属する菌の孢子とパラスポラルボディとを
含む孢子嚢がコガネムシ科昆虫の幼虫に対し優れた殺虫効果及び幼虫の生育抑制
効果を有することが確認された。

(生物試験例 3)

本発明の製造方法（液体培養）により得られた孢子嚢によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。実施例 6 に示した液体培地（E-2）の培養により得た孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエ・セマダラの孢子嚢を蒸留水に 1×10^9 個/ml となるよう懸濁し孢子嚢液を調製した。

直径 6 cm のプラスチックカップ 40 個に腐葉土 20 g ずつを入れた。そのうちの 20 個に対して、孢子嚢数が 1×10^9 個/カップとなるよう孢子嚢液を散布した。残りの 20 個には孢子嚢液を散布せず、対照試験とした。それぞれのカップにドウガネブイブイ 2 令幼虫を 1 頭ずつ入れ、25℃の培養装置内で 40 日間飼育し、経時的に死亡個体数を調べ、累積死亡率（%）を調べ、その結果を表 16 に示した。

表 16

	累積死亡率（%）			
試験区	10日目	20日目	30日目	40日目
対照	0	0	0	0
孢子嚢添加	10	40	90	100

表 16 に示した結果から、得られた孢子嚢は殺虫活性を示し 40 日目までに全ての幼虫が死亡した。すなわち、実施例 6 で得られた孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエ・セマダラの孢子嚢がコガネムシ科昆虫の幼虫に対し優れた殺虫効果及び幼虫の生育抑制効果を有することが確認された。

What is claimed is:

1. バチルス・ポピリエに属する菌を、吸着剤を含む液体培地で培養し、孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢を製造する方法において、
5 前記液体培地が0.1～0.7質量%のプロリンを含むことを特徴とする孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢の製造方法。
- 10 2. 前記液体培地中に含まれる全アミノ酸に対するプロリンの割合が10～65質量%である請求項1記載のバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢の製造方法。
- 15 3. 前記液体培地中に含まれる吸着剤の割合が0.05～5質量%である請求項1記載のバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢の製造方法。
4. 前記液体培地がさらにピルビン酸を含む請求項1に記載のバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢の製造方法。
- 20 5. 前記液体培地中のピルビン酸の割合が0.01～0.5質量%の範囲にある請求項4記載のバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢の製造方法。
6. 前記バチルス・ポピリエに属する菌が、バチルス・ポピリエ・セマダラ、バチルス・ポピリエ・マメ、バチルス・ポピリエ・ヒメ、バチルス・ポピリエ・サクラである請求項1、3又は4に記載のバチルス・ポピリエに属する菌の孢子嚢の製造方法。
25

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

- 培地単位体積当たりの生産数の高い、孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエの孢子囊の製造方法を提供する。バチルス・ポピリエに属する菌
- 5 を、吸着剤を含む液体培地で培養し、孢子とパラスポラルボディとを含むバチルス・ポピリエに属する菌の孢子囊を製造する方法において、前記液体培地が0.1～0.7質量%のプロリンを含む。